

FR00/2523



REC'D 11 OCT 2000

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

ESU.

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 11 SEP. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **14 SEPT 1999**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9911465**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**
DATE DE DÉPÔT **14 SEP 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET BEAU DE LOMENIE
158, rue de l'Université
75340 PARIS CEDEX 07

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire
☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

☐ demande initiale
☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent H234420/14-FG références du correspondant 01.44.18.89.00 téléphone

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance ☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

"Compositions vaccinales destinées à une administration par voie muqueuse"

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

CAPSULIS

Forme juridique

Société Anonyme

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

218-228, avenue du Haut-Lévêque
33600 PESSAC

Pays

FR

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine numéro date de dépôt nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)
GIRAUD François **CPI N° 92-4022**

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

(Signature manuscrite)

(Signature manuscrite)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99M465

TITRE DE L'INVENTION :

**"Compositions vaccinales destinées à une administration par voie
muqueuse".**

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

CAPSULIS

"SOCIÉTÉ ANONYME"

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

1° GAUBERT Sophie
Résidence de l'Horloge
Appart. 28
97, Rue Saint Sébastien
59800 LILLE
FRANCE

2° LAVERSANNE René
62, Avenue du Parc d'Espagne
33600 PESSAC
FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

PARIS LE 14 SEPTEMBRE 1999



Françoise GIRAUD
Conseil en Propriété Industrielle
B.I. - N° 92 4022
Cabinet BEAU DE LOMENTIE

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

[illegible]

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention « R.M. » (revendications modifiées).

~~BEST AVAILABLE COPY~~

La présente invention concerne de nouvelles compositions vaccinales destinées à une administration par voie muqueuse.

5 On donne ci-après quelques définitions :

Administration par voie muqueuse : administration non invasive de l'antigène à un site muqueux, par exemple

- aire naso-pharyngée
- aire buccale
- 10 - arbre bronchique
- intestin
- tractus uro-génital
- oreille interne
- conjonctive
- 15 - glandes mammaires, salivaires et lacrymales.

Parmi ces différents constituants du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT), certaines voies d'introduction sont d'un accès et d'une acceptabilité plus aisés : nasale, buccale, gastro-intestinale, rectale et vaginale.

20 Réponse muqueuse : réponse du système immunitaire au niveau des muqueuses caractérisée par une production d'IgA (isotype en concentration importante dans les muqueuses) et d'IgG et/ou une réponse cellulaire au sein du site muqueux et des ganglions drainants.

25 Réponse systémique : réponse du système immunitaire généralisée se traduisant par la présence d'anticorps circulants (IgG et aussi IgA) et/ou une réponse cellulaire (Thelper ou CTL) dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions).

30 Dissémination de la réponse : installation d'une réponse muqueuse dans d'autres compartiments que celui de l'induction, du fait de la circulation et de la relocalisation des lymphocytes induits au site d'administration (IgA vaginales après administration nasale par exemple).

Adjuvant : substance ajoutée à l'antigène de manière à amplifier et orienter la réponse immunitaire spécifique de cet antigène.

35 Vecteur synthétique/vectorisation : incorporation de l'antigène dans ou à la surface d'une particule ou vésicule, de manière à protéger l'antigène et/ou à faciliter sa capture par les cellules compétentes du système immunitaire et/ou à faciliter l'apprêtement de l'antigène par lesdites cellules, et ainsi à amplifier la réponse

immunitaire. L'addition d'un vecteur vide à l'antigène libre n'apporte pas ou peu d'amplification.

Jusqu'à récemment, les vaccins étaient obtenus à partir de micro-organismes tués, atténués ou moins virulents. L'industrie pharmaceutique
 5 aujourd'hui cherche à éviter cette approche à la fois pour des raisons de limitation des effets secondaires, de facilité de production, de sécurité d'administration et d'efficacité.

Les progrès de la biologie moléculaire ont permis la production industrielle de sous-unités de ces micro-organismes en particulier des protéines
 10 dites recombinantes, qu'elles soient membranaires, nucléaires ou cytoplasmiques. Malheureusement ces sous-unités ne sont pas assez immunogènes par elles-mêmes pour apporter une réponse suffisante dans l'optique de la vaccination.

Elles ont besoin d'être adjuvantées ou vectorisées pour induire une réponse suffisante.

15 Aujourd'hui, les seuls adjuvants acceptés en médecine humaine sont l'hydroxyde ou le phosphate d'aluminium ainsi que le phosphate de calcium. Ces sels se présentent sous la forme d'une suspension de grains de sel d'aluminium ou de calcium, à la surface desquels est adsorbé l'antigène. Ils présentent plusieurs inconvénients : ils induisent des réactions locales inflammatoires et la production
 20 d'IgE, ils ne sont pas efficaces pour tous les antigènes et ils sont incapables d'engendrer des réactions à médiation cellulaire de type CTL. De fait, ils ne sont pas utilisés jusqu'à présent dans le cas d'administration par voie muqueuse.

Or, l'importance des surfaces muqueuses est considérable, d'une part parce qu'elles sont présentes au niveau de tous les tractus et d'autre part parce
 25 qu'elles sont la première ligne de défense contre l'invasion des agents pathogènes.

La protection des surfaces muqueuses est assurée à la fois par des mécanismes de défense innés ou non adaptatifs (péristaltisme, mouvements ciliés et mucus) et par la mise en place d'une réponse immune cellulaire et humorale adaptative spécifique de l'agent pathogène qui peut se généraliser aux autres
 30 organes lymphoïdes. C'est le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT) qui est responsable de la composante spécifique.

A cet égard, la vaccination par voie muqueuse représente un enjeu considérable.

Aujourd'hui, tous les vaccins sauf celui contre la poliomyélite sont
 35 injectables, ce qui implique :

- Une médicalisation

- Un mauvais accueil
- Un inconfort (fièvre, douleur au site d'injection...)
- Des risques de contamination (HIV, hépatites)
- Un coût élevé dans les pays en voie de développement

5 L'administration par voie muqueuse présenterait un avantage pour différentes raisons :

- des coûts de production moins élevés liés à des conditions de préparation moins contraignantes que celles pour un vaccin injectable
- son caractère non invasif qui élimine les problèmes liés à l'injection

10 décrits ci-dessus

Pour cela, elle devrait :

- procurer une immunité aux sites d'administration muqueux, permettant de renforcer par une réponse spécifique la barrière muqueuse, d'où un intérêt pour les infections transmissibles par voie muqueuse (aériennes, 15 génitales....)

- procurer une immunité systémique et une réponse effectrice généralisée suite à une administration aisée

- ne pas entraîner d'effets secondaires (irritation locale).

20 Pour une revue assez complète sur l'immunologie des muqueuses on pourra se reporter au "Handbook of mucosal immunology", édité par Pearay Ogra *et al*, 1994, Academic press, Inc. san Diego Californie, USA.

25 De nombreux essais et études ont été réalisés afin de développer de nouveaux adjuvants et vecteurs capables d'induire une réponse muqueuse et systémique efficace en terme de protection contre l'agent pathogène. Différents travaux portent sur l'utilisation de vecteurs vivants recombinants (bactéries ou virus atténués), de vecteurs synthétiques (complexes immunostimulants encore appelés iscoms, ce qui correspond à une abréviation de l'expression anglaise "immunostimulating complexes", liposomes, microsphères...) ou de toxines de 30 micro-organismes (toxine cholérique -CT- ou toxine thermolabile d'*E. Coli* -LT-). Cependant, une grande partie de ces études est encore au stade de la mise au point et la majorité des formulations présentent des inconvénients :

- haute toxicité (CT et LT) et donc impossibilité d'utilisation chez l'homme,
- difficultés de préparation (microsphères),
- 35 - faible stabilité (liposomes),
- faible efficacité (liposomes).

Plusieurs brevets concernent l'administration par voie muqueuse d'antigènes, vectorisés ou adjuvantés par différents systèmes. On peut citer :

- EP 0 440 289 (Duphar) qui décrit l'utilisation de liposomes en mélange avec un antigène pour la vaccination contre la grippe. Il s'agit là d'un effet adjuvant des lipides, le même résultat étant obtenu lorsque l'antigène est mélangé extemporanément avec les liposomes vides.

- WO 98/10748 (The School of Pharmacy) utilisant des liposomes cationiques, dans le cas d'une injection ou d'une administration par voie muqueuse,

- US 5,679,355 (Proteus) décrivant des vésicules non ioniques, qui peuvent être administrées par voie parentérale ou muqueuse (surtout orale).

D'autre part, une très abondante littérature scientifique décrit l'utilisation de microparticules polymères comme vecteur d'antigène par voie muqueuse. Une bonne revue de cette littérature peut être trouvée dans : D. T. O'HAGAN, Adv. Drug Deliv. Rev., 34 (1998) 305-320.

Cependant, aucune de ces technologies n'a abouti aujourd'hui à un produit sur le marché. Les méthodes de présentation de l'antigène doivent donc encore être améliorées et le développement de nouveaux adjuvants ou vecteurs d'antigènes demeure un besoin urgent dans l'industrie du vaccin.

Parmi les vésicules, objets sphériques formés d'arrangement moléculaires de molécules amphiphiles, les vésicules multilamellaires à structure en oignon ont fait l'objet d'importantes recherches et ont donné lieu à plusieurs brevets (WO 93/19735 ; WO 95/18601 ; WO 97/00623 ; WO 98/02144 ; WO 99/16468). Elles se distinguent des liposomes par :

- leur mode de préparation qui part d'une phase lamellaire à l'équilibre thermodynamique

- leur structure interne cristal-liquide formée d'un empilement de bicouches concentriques d'amphiphiles alternant avec des couches d'eau ou de solution aqueuse ou de solution d'un liquide polaire (glycérol, par exemple)

- la nature variée des molécules amphiphiles qui peuvent être utilisées pour les constituer, seules ou en mélange.

La demande internationale WO 99/16468 décrit des vésicules à structure en oignon incorporant en leur sein un antigène et permettant d'amplifier la réponse immunitaire de cet antigène. Cette demande internationale qui décrit pour la première fois l'incorporation (également désignée dans ce document par encapsulation) d'antigènes au sein d'une vésicule multilamellaire à structure en

oignon montre clairement dans ses exemples qu'une telle encapsulation permet très nettement d'amplifier la réponse immunitaire lors d'une administration parentérale d'un antigène encapsulé dans une vésicule multilamellaire à structure en oignon.

5 Les inventeurs de la présente invention ont maintenant découvert que l'administration par voie muqueuse, en particulier nasale, des compositions du type de celles décrites dans la demande WO 99/16468, engendre une réponse immunitaire non seulement au sein de différents sites muqueux mais également dans le compartiment systémique. Cette réponse est caractérisée par l'induction
10 d'immunoglobuline A. Un tel résultat n'était nullement évident au vu de la demande WO 99/16468 puisque dans les conditions où était faite l'injection dans les exemples de cette demande, l'antigène, même sous forme encapsulée, n'induisait pas de réponse IgA détectable.

15 Les immunoglobulines (Ig) ou anticorps (Ac), associés à des composants cellulaires, sont des acteurs essentiels dans la réponse immunitaire dirigée contre un pathogène. Les Ig sont des protéines hautement spécifiques de l'antigène.

20 Différentes classes d'anticorps ont été répertoriées, qui se distinguent par leur mode d'induction, leur localisation et leur fonction (reconnaissance, neutralisation d'activité toxique ou enzymatique).

Dans le compartiment sanguin, la majorité des Ig produites est des IgG circulants (sub-divisé en différentes sous-classes), les IgA et les IgE restant très minoritaires. A l'inverse, l'isotype majeur dans les muqueuses est l'IgA qui est produite par les plasmocytes à IgA du système lymphoïde muqueux et sécrétée
25 activement par l'épithélium de la muqueuse.

Les IgA sont des anticorps spécialisés et adaptés à la défense des surfaces muqueuses constamment exposées aux pathogènes. Adaptés, car, du fait de leur structure biochimique (glycosylation, polymérisation, pièce sécrétoire), ils résistent aux effets des protéases sécrétées par les micro-organismes et car,
30 contrairement aux autres isotypes, ils limitent les réactions inflammatoires dans ces compartiments en état d'activation constant. Spécialisés, car ils agissent à plusieurs niveaux : sécrétés, ils agglutinent les pathogènes, limitent par neutralisation les effets des toxines et l'entrée des pathogènes ; ils peuvent également agir au sein de l'épithélium au cours de leur transcytose ou dans la
35 lamina propria. Ils représentent donc une barrière active essentielle qui, associée à des mécanismes, limitent l'invasion par les pathogènes. Naturellement, à la

réponse anticorps, s'associent des réponses cellulaires cytotoxiques et spécifiques qui visent à éliminer le pathogène. Si la réponse locale ne suffit pas, une réponse systémique est enclenchée.

5 Une des caractéristiques très intéressantes du système immunitaire muqueux est la recirculation des lymphocytes B et T induits à un site muqueux et leur possible domiciliation dans d'autres sites que ceux de l'induction, propageant ainsi la réponse spécifique aux autres tractus. Ce phénomène est très intéressant en terme de vaccination.

10 Alors que les mécanismes d'induction d'une réponse immune muqueuse sont en cours d'élucidation, il reste souvent extrêmement difficile d'induire une réponse muqueuse par l'administration parentérale d'un antigène (adjuvanté ou non) et même par administration muqueuse de l'antigène. En effet, l'administration par voie parentérale d'un antigène conduit à l'induction d'anticorps spécifiques circulants, de type IgG. Ce type d'injection ne permet pas d'induire des
15 IgA au sein des compartiments muqueux (ni systémique). Il est très clair que la vaccination parentérale ne renforcera pas les défenses naturelles locales nécessaires pour lutter contre beaucoup d'infections respiratoires ou génitales par exemple.

Pour ces différentes raisons, il est tout à fait surprenant, même au vu
20 de l'enseignement de WO 99/16468 que le même antigène incorporé dans les mêmes vésicules, administrées par voie muqueuse (nasale) induise non seulement une réponse systémique (IgG dans les sérums) confirmant par une autre voie les précédents résultats, mais également une réponse dans les sites muqueux. L'incorporation de l'antigène dans les vésicules à structure en oignon engendre la
25 production d'IgA dans le compartiment lié au site d'administration (broncho-pulmonaire) mais aussi dans les autres compartiments muqueux avec une prédominance dans les sécrétions génitales. De plus, il faut noter que l'albumine de sérum humain (HSA), utilisée à titre d'exemple, est un antigène très faiblement immunogène, qui, administré par voie nasale, seul, sans être incorporé dans des
30 vésicules est incapable d'induire une quelconque réponse qu'elle soit muqueuse ou systémique.

De plus, on peut remarquer que l'administration par voie muqueuse nécessite par rapport à l'administration parentérale la prise en charge de l'antigène dans la muqueuse et donc la pénétration de l'antigène, ce qui implique que
35 l'antigène doit être présenté de manière optimale afin de dépasser les mécanismes de défense non spécifiques (mouvements ciliés, mucus) et de résister aux enzymes

présents dans la muqueuse ou à sa surface. Il apparaît que ces paramètres sont optimisés par la structure des vésicules lors de l'administration muqueuse. Ces fonctions des vésicules dans l'administration muqueuse n'étaient pas nécessairement présentes lors de l'administration parentérale, où l'injection permet
5 d'atteindre directement des zones plus favorables à une capture par les cellules du système immunitaire.

Le résultat observé par administration muqueuse n'est donc pas une simple extrapolation du résultat obtenu par administration parentérale, mais la mise en évidence d'une nouvelle fonctionnalité des vésicules à structure en
10 oignon.

Les inventeurs de la présente invention ont maintenant découvert que des vésicules identiques à celles décrites dans la demande internationale WO 99/16468 incorporant un antigène provoquaient une réponse immunitaire beaucoup plus forte que l'administration de l'antigène libre. De plus, pour certains
15 antigènes qui n'induisent aucune réponse par administration muqueuse, leur administration, incorporés au sein de vésicules multilamellaires à structure en oignon, permet d'induire une réponse tout à fait remarquable. Enfin la réponse induite se retrouve non seulement au niveau local dans le compartiment muqueux (réponse muqueuse) mais aussi dans la circulation sanguine (réponse systémique
20 sérique).

D'autre part, ces vésicules multilamellaires sont préparées à partir de constituants biocompatibles connus pour leur innocuité. De plus, le procédé de préparation est de mise en œuvre simple et ne fait appel qu'à des appareils courants de la chimie. Le fait que le procédé fasse appel à une phase lamellaire
25 initiale à l'équilibre thermodynamique lui donne une excellente reproductibilité et permet une grande stabilité des vésicules obtenues.

Ainsi, selon l'une de ses caractéristiques essentielles, l'invention concerne une utilisation de vésicules multilamellaires à structure en oignon présentant une structure interne cristal-liquide formée d'un empilement de
30 bicouches concentriques à base d'agents amphiphiles alternant avec des couches d'eau, de solution aqueuse ou de solution d'un liquide polaire et au sein desquelles se trouve incorporé au moins un antigène, pour la fabrication d'une composition vaccinale destinée à une administration par voie muqueuse pour induire une réponse muqueuse et/ou systémique sérique.

35 Par le terme "incorporé" dont l'utilisation nous semble préférable à celle du terme "encapsulé", on entend que le ou les antigènes font partie intégrante

de l'entité constituée par la vésicule. En effet, on peut trouver des molécules d'antigène(s) dans n'importe quelle couche comprise entre le centre et la périphérie de ladite vésicule.

5 Ces vésicules ont généralement des diamètres compris entre 0,1 et 25 μm , de préférence entre 0,2 et 15 μm .

10 Plus précisément, les vésicules utilisées selon l'invention sont de préférence constituées de plusieurs couches d'agents amphiphiles alternant avec des couches de phase aqueuse ou polaire. L'épaisseur de chacune de ces couches est une épaisseur moléculaire, typiquement de l'ordre de 5 à 10 nanomètres. Pour
15 un empilement d'une dizaine à quelques centaines de couches, on obtient donc un diamètre compris entre 0,1 μm et quelques dizaines de micromètres. C'est ce qui est observé expérimentalement, les vésicules étant observables en microscopie optique (en lumière polarisée afin d'avoir un meilleur contraste lié à leur biréfringence), soit comme des points non résolus pour les plus petites d'entre
20 elles, soit comme des sphères biréfringentes pour les plus grosses. Le profil de tailles peut être étudié à l'aide d'un granulomètre laser (utilisant la diffusion statique d'un faisceau laser, analysée sous plusieurs angles). On obtient en général un profil gaussien centré sur une valeur variant entre 0,1 et 25 μm montrant une faible hétérogénéité de la taille pour une formulation donnée, dans des conditions opératoires de préparation données.

25 Les vésicules dans lesquelles se trouve incorporé l'antigène ont, comme exposé précédemment, une structure multilamellaire en oignon et sont constituées, de leur centre jusqu'à leur périphérie, d'une succession de couches lamellaires séparées par un milieu liquide. Ces vésicules peuvent être obtenues par
un procédé comprenant la préparation d'une phase lamellaire cristal-liquide et sa transformation par application d'un cisaillement. Un tel procédé est en particulier décrit dans le brevet WO 93/19735 issu du brevet français FR-2 689 418 ou WO 95/18601 introduits ici par référence.

30 Selon le brevet français FR-2 689 418, cette transformation peut être faite lors d'une étape de cisaillement homogène de la phase cristal-liquide, ce qui conduit à des vésicules encore appelées microcapsules de taille contrôlée. Toutefois, en jouant sur la formulation de la phase lamellaire cristal-liquide, en particulier sur la nature des tensioactifs entrant dans sa composition, la transformation de cette phase cristal-liquide en vésicules peut être obtenue par
35 simple sollicitation mécanique, en particulier lors du mélange des constituants.

De telles vésicules présentent, entre autres, l'avantage de pouvoir être préparées par un procédé de préparation particulièrement simple permettant d'utiliser une grande variété de tensioactifs.

Un autre avantage, lié lui aussi essentiellement au procédé utilisé pour
5 préparer les vésicules à structure en oignon utilisées selon l'invention, réside dans le fait que l'on incorpore les actifs et les additifs préalablement à la formation des vésicules, ce qui permet un excellent rendement d'encapsulation, d'où une meilleure efficacité et une économie très importante pour des molécules extrêmement coûteuses.

10 De telles structures sont avantageusement obtenues par incorporation d'au moins un antigène dans une phase lamellaire cristal-liquide comprenant au moins un agent tensioactif puis transformation de cette phase cristal-liquide lamellaire en une phase dense de vésicules multilamellaires de petite taille.

Ainsi, les vésicules utilisées selon l'invention peuvent être obtenues
15 selon un procédé selon lequel on prépare une phase cristal-liquide lamellaire incorporant au moins un antigène et on provoque le réarrangement de ladite phase cristal-liquide en vésicules multilamellaires par application d'un cisaillement.

Ce cisaillement pourra être un cisaillement homogène, ce qui présente l'avantage de conduire à des vésicules de taille parfaitement homogène. Toutefois,
20 une simple agitation mécanique pourra s'avérer suffisante pour conduire à la formation des vésicules multilamellaires de l'invention.

L'antigène pourra être toute molécule pour laquelle on souhaite engendrer une réponse immunitaire, qu'il ait une origine exogène tel qu'un organisme pathogène infectieux, parasites ou micro-organismes (levures,
25 champignons, bactéries ou virus) ou une origine naturelle intrinsèque (cas des maladies auto-immunes ou de la cancérisation). Il peut être de différentes natures biochimiques.

Il peut, en particulier, s'agir d'un antigène choisi dans le groupe constitué :

- 30 - des protéines, en particulier des protéines extraites ou recombinantes, glycosylées ou non,
- des peptides,
- des lipopeptides,
- des polysaccharides,
35 ou représentant un mélange de plusieurs de ces composants.

Les vésicules multilamellaires à structure en oignon sont préparées selon les méthodes décrites précédemment, en particulier dans la demande internationale W0 99/16468. Les molécules amphiphiles utilisées pour leur préparation seront choisies, sans que cela soit une obligation, parmi les molécules
 5 faisant l'objet d'une description dans la pharmacopée, ou déjà utilisées dans des médicaments appliqués aux muqueuses.

Selon une variante avantageuse, les membranes des vésicules contenues dans les compositions de l'invention contiennent au moins un agent tensioactif choisi dans le groupe constitué :

- 10 - des phospholipides hydrogénés ou non hydrogénés,
- des acides gras en C₆ à C₃₀, saturés ou mono- ou polyinsaturés, linéaires ou ramifiés, sous forme d'acide ou de sel d'un métal alcalin, alcalino-terreux ou d'une amine,
- des esters, éthoxylés ou non, de ces mêmes acides gras et
- 15 . de saccharose,
- . de sorbitan,
- . de mannitol,
- . de glycérol ou de polyglycérol,
- . de glycol,
- 20 - des mono-, di- ou triglycérides ou des mélanges de glycérides de ces mêmes acides gras,
- des alcools gras en C₆ à C₃₀, saturés ou mono- ou polyinsaturés, linéaires ou ramifiés, éthoxylés ou non,
- des éthers, éthoxylés ou non, de ces mêmes alcools gras et
- 25 . de saccharose,
- . de sorbitan,
- . de mannitol,
- . de glycérol ou de polyglycérol,
- . de glycol,
- 30 - des huiles végétales polyéthoxylées, hydrogénées ou non hydrogénées,
- des polymères séquencés de polyoxyéthylène et de polyoxypropylène (poloxamères),
- de l'hydroxystéarate de polyéthylèneglycol,
- des alcools à squelette stérol tel que le cholestérol, le sistostérol,
- 35 - des sphingolipides,
- des polyalkylglucosides,

- des copolymères de polyéthylèneglycol et d'alkylglycol (par exemple la famille des ELFACOS de AKZO NOBEL),
- des copolymères di- ou tribloc d'éthers de polyéthylèneglycol et de polyalkylèneglycol (par exemple la famille des ARLACELL de ICI).

5 A ces tensioactifs qui peuvent être utilisés seuls ou en mélange, on peut éventuellement ajouter des co-tensioactifs afin d'améliorer la rigidité et l'étanchéité des membranes formant la vésicule. Parmi ces molécules, on peut citer :

- le cholestérol et ses dérivés, en particulier les esters de cholestérol
- 10 chargés ou neutres comme le sulfate de cholestérol
- les autres dérivés à squelette stérol, en particulier ceux d'origine végétale (sitostérol, sigmastérol...)
- les céramides.

15 La formulation fait avantageusement intervenir un mélange de molécules tensioactives. Il est généralement utilisé au moins deux tensioactifs différents ayant des balances hydrophile-lipophile différentes, ce qui permet de régler en continu les propriétés des bicouches et ainsi de contrôler l'apparition de l'instabilité qui gouverne la formation des vésicules multilamellaires.

20 Ainsi, on choisira avantageusement parmi les tensioactifs ci-dessus, deux tensioactifs présentant des propriétés relativement différentes, en particulier une balance hydrophile-lipophile (HLB) différente. Le premier tensioactif présentera avantageusement une balance hydrophile-lipophile comprise entre 1 et 6, de préférence entre 1 et 4, alors que le deuxième tensioactif aura une balance hydrophile-lipophile comprise entre 3 et 15, de préférence comprise entre 5 et 15.

25 La préparation obtenue après transformation de la phase lamellaire cristal-liquide en vésicules multilamellaires peut ensuite être diluée, en particulier avec un solvant aqueux tel que, par exemple, une solution tampon, une solution saline ou une solution physiologique, pour obtenir ainsi une suspension aqueuse de vésicules.

30 La technique d'encapsulation utilisée selon la présente invention permet d'atteindre aisément des rendements d'encapsulation très élevés, voire voisins de 100 %. Toutefois, de tels rendements ne sont pas toujours indispensables en fonction des applications visées.

35 Ainsi, le rendement d'encapsulation du (ou des) antigène(s) dans les compositions de l'invention est avantageusement supérieur à 50 %, de préférence supérieur à 80 %.

Il semble que la structure des vésicules soit responsable des résultats particulièrement avantageux obtenus, et que les vésicules multilamellaires de l'invention permettent à l'antigène d'arriver intact jusqu'aux cellules présentatrices de l'antigène (CPA) et de favoriser sa capture par ces cellules. Il semble donc bien que la fonction des vésicules de l'invention est de vectoriser, de protéger et d'améliorer la capture de l'antigène par le système immunitaire.

Un autre avantage de la technologie est que l'on peut rajouter à cette formulation des polymères naturels ou artificiels tels que les polysaccharides (alginates, chitosan, etc.) afin de renforcer la solidité de la vésicule, et lui permettre de rester plus longtemps sur le site d'administration ou dans l'organisme, délivrant ainsi l'antigène sur un temps plus long. Ces polymères peuvent être aussi bien incorporés dans la vésicule, que déposés autour sous la forme d'un enrobage. Dans ce cas la vésicule ou la particule formée des vésicules enrobées dans la matrice polymère a un diamètre supérieur à celui des vésicules seules. Ces polymères peuvent éventuellement être réticulés pour renforcer encore leur solidité.

De plus, et c'est un des autres avantages de la technologie, la formulation peut être complétée par l'addition de molécules immuno-modulatrices (chitosan, interleukines...) qui renforceront par leurs propriétés intrinsèques l'amplification et l'orientation de la réponse immunitaire.

Les vésicules incorporant les antigènes sont avantageusement préparées dans un procédé consistant à préparer, dans un premier temps, la phase lamellaire. Celle-ci s'obtient par simple mélange des ingrédients, dans un ordre déterminé par l'expérimentateur d'après les miscibilités de chacun des constituants. Il peut être nécessaire de chauffer certains constituants pâteux ou solides afin de faciliter leur incorporation. Dans ce cas on additionne l'antigène de préférence en fin de mélange afin de lui éviter de subir une température trop élevée. On peut aussi préparer un mélange de tous les constituants sauf de l'antigène ou sa solution aqueuse sous forme d'un mélange « stock » qu'on utilisera selon les besoins pour préparer la phase lamellaire. La solution aqueuse peut contenir différents constituants destinés à assurer sa compatibilité biologique et en particulier des mélanges tampons mais également différents antigènes. La phase lamellaire ainsi préparée est ensuite soumise à un cisaillement modéré (de 0 à 1000s⁻¹) pendant un temps limité (de 0 à 60 minutes).

Dans la plupart des cas, ce cisaillement est obtenu directement par l'action du dispositif ayant servi au mélange. Pour les très petites quantités, il peut

être obtenu à la main par mélange de la préparation à l'aide d'une microspatule dans un tube de type Eppendorf.

La phase lamellaire cisailée est ensuite dispersée dans un milieu final, en général de l'eau ou un tampon, identique ou différent de celui ayant servi lors de la préparation de la phase lamellaire. Cette dispersion se fait avantageusement à température ambiante (20-25°C) par addition lente du milieu sur la phase lamellaire sous agitation constante.

Un conservateur et éventuellement d'autres additifs destinés à compléter la formulation galénique peuvent être ajoutés au produit.

Toutes les compositions décrites précédemment comprenant au moins un antigène incorporé au sein des vésicules à structure lamellaire en oignon présentent l'avantage de pouvoir être utilisées pour une administration par voie muqueuse et tout particulièrement par voie nasale et d'induire une réponse muqueuse et/ou systémique sérique.

L'exemple donné ci-après met clairement en évidence un tel effet.

Les figures 1 et 2 ci-jointes rassemblent les réponses obtenues d'une part dans différents prélèvements muqueux (figure 1) et d'autre part dans les sérums des animaux (figure 2) après une administration par voie nasale de compositions selon l'invention (groupe I) en comparaison avec ceux obtenus par administration soit des compositions dans lesquelles le même antigène est libre (groupe II), soit de compositions contenant les mêmes vésicules mais vides (groupe III).

EXEMPLE

I - Préparation de vésicules contenant de l'albumine de sérum humain (HSA)

Formulation (en pourcentage en poids)

① Potassium oléate (FLUKA) :	05,0 %
② Alcool laurique éthoxylé à 4 oxydes d'éthylène (SEPPIC) :	02,0 %
③ Cholestérol de lanoline (FLUKA) :	05,0 %
④ Cholestérol 3-sulfate (SIGMA) :	02,5 %
⑤ PBS 1x stérile (LIFE TECHNOLOGIES) :	20,0 %
⑥ Lécithine de soja Phospholipon 90G (NATTERMANN) :	45,5 %
⑦ Albumine humaine (SIGMA) à 30 mg/ml dans du PBS 1x :	20,0 %

Mode opératoire

Les composants sont stérilisés par irradiation UV pendant 60 mn. Les contenants et accessoires (spatules, agitateurs...) sont stérilisés à la flamme juste avant utilisation.

- 5 Les constituants ❶ à ❸ sont introduits dans un pilulier, dans un ordre indifférent, puis chauffés à 80°C pendant 60 min sous très forte agitation magnétique. La solubilisation totale des constituants ❸ et ❹ est vérifiée par observation microscopique.

- 10 On introduit à température ambiante dans un tube Eppendorf de 1,5 ml stérile la quantité désirée du mélange ❶ à ❸ puis on rajoute les constituants ❹ et ❺. L'ensemble est homogénéisé à l'aide d'une aiguille stérile, puis laissé au repos une nuit à 4°C.

La préparation est ensuite dispersée à 33,33 % dans du PBS 1x stérile.

15 **II - Protocole d'immunisation**

- Afin de tester l'effet des vésicules selon l'invention lors d'une administration muqueuse, des souris BALB/c femelles de 6-8 semaines ont reçu, par voie nasale, deux fois (à J0 et J30), différentes préparations décrites ci-dessous. L'administration par voie nasale nécessite l'anesthésie des animaux par une solution, mélange de Kétamine, Valium et Atropine, injectée par voie intra-péritonéale. Un mois après la dernière immunisation, les animaux sont sacrifiés, les sérums sont collectés et les prélèvements des sécrétions muqueuses effectués, à l'exception des lavages vaginaux qui sont prélevés sur la souris vivante pendant les trois jours précédents la fin de l'expérimentation.

25

Groupes d'immunisation

- Les souris ont été réparties en 4 groupes notés I à IV, le groupe IV constituant un groupe témoin (souris non immunisées également dénommées souris naïves) et les autres groupes étant soumis à un protocole d'immunisation tel que défini précédemment au moyen des produits suivants :

30

- groupe I :

- ♦ HSA encapsulée : 20µl par narine de vésicules selon l'invention incorporant HSA ce qui correspond à 8 µg de HSA par souris

35

- groupe II :

- ♦ HSA : 20µl par narine d'une solution de HSA correspondant à 8 µg par souris

5

- groupe III :

- ♦ Vésicules vides : 20µl par narine de vésicules selon l'invention vides

Prélèvements des sécrétions

Tous les prélèvements sont effectués avec des solutions froides (4°C) et sont entreposés sur glace au fur et à mesure afin de limiter les dégradations par les enzymes protéolytiques.

10

Lavages broncho-alvéolaires :

La trachée des souris est canulée à l'aide d'une sonde et 750µl de PBS sont injectés lentement afin de ne pas créer d'hémorragie, les poumons sont lavés ainsi 3 fois avec la même solution, le prélèvement est ensuite centrifugé afin d'éliminer les cellules pulmonaires et séparé en fractions aliquotes conservées à -20°C jusqu'au dosage.

15

20 *Lavages vaginaux*

Ces prélèvements sont réalisés sur la souris vivante non anesthésiée, par injection de 50µl de PBS dans l'orifice du vagin, le vagin est lavé 3 fois avec la même solution. Ce type de prélèvement est renouvelé durant 3 jours consécutifs afin de couvrir les variations dues au cycle hormonal de la souris. Les sécrétions sont groupées et conservées à -20°C.

25

Lavages intestinaux

L'intestin est prélevé, libéré du mésentère et rincé dans l'eau afin d'éliminer le sang extérieur. Il est ensuite découpé longitudinalement et incubé sur glace dans 1 ml d'une solution de lavage enrichie en inhibiteur de protéases. L'ensemble est centrifugé et le surnageant est récupéré et congelé à -20°C.

30

Dosage des anticorps

Les anticorps spécifiques de HSA présents dans les sérums et sécrétions sont dosés par technique ELISA où l'on détermine les IgA et IgG spécifiques de HSA (anti-IgA biotinyle/Streptavidine peroxydase, anti-IgG

35

peroxydase). Les résultats sont exprimés en titre moyen déterminé par rapport à un sérum de référence de souris naïve et correspondant à l'inverse de la dilution égale au seuil de référence.

5 III - Résultats

Les résultats du dosage des anticorps spécifiques sont présentés sous la forme de 2 figures (figure 1 et figure 2) illustrant respectivement les réponses anticorps obtenues dans les prélèvements muqueux pour la réponse associée aux muqueuses et dans les sérums des animaux (réponse systémique).

10 Sur ces figures, on a également indiqué dans chaque cas le nombre de souris ayant réagi au protocole d'immunisation par rapport au nombre de souris soumises à ce protocole (la mention "n/m" signifiant que n souris ont réagi sur m souris soumises au protocole d'immunisation).

15 Il apparaît clairement au vu de ces deux figures que l'administration par voie nasale de vésicules selon l'invention incorporant HSA entraîne une production importante d'anticorps dans les poumons (Figure 1). Seule l'immunisation sous la forme encapsulée engendre une réponse immune pulmonaire d'isotype IgA et IgG (l'existence au niveau pulmonaire de ces deux isotypes est rapportée dans différentes publications). Bien que cette voie
20 d'administration ne soit pas la plus aisée chez l'animal, tous les animaux immunisés par voie nasale avec les vésicules selon l'invention sont répondeurs.

L'analyse des autres prélèvements muqueux révèle la présence d'IgA spécifique de HSA dans le vagin et l'intestin des animaux immunisés par les vésicules selon l'invention incorporant HSA, muqueuses très distantes du site
25 d'administration avec une prédilection pour la muqueuse vaginale. Ces réponses indiquent une généralisation de la réponse induite dans le tissu lymphoïde muqueux pulmonaire ou nasal et la circulation et la redistribution des lymphocytes activés et différenciés près du site d'administration.

A la différence de la muqueuse pulmonaire, la réponse isotype spécifique de HSA prédominante dans l'intestin et le vagin est l'IgA. Bien que le titrage des IgG_{H+L} n'ait pu être réalisé dans les lavages vaginaux, des expériences similaires réalisées avec un autre antigène indique la prédominance des IgA dans les sécrétions vaginales.

35 Seule la forme vectorisée de l'antigène conduit à une réponse intense et spécifique. Les quelques animaux présentant une réponse IgA détectable dans les groupes immunisés par HSA libre (titre de 3 contre 650 dans les sécrétions

vaginales avec les vésicules selon l'invention contenant HSA) ne sont pas différenciables du groupe vésicules selon l'invention vides.

L'étude des sérums des animaux (Figure 2) indique que les vésicules selon l'invention incorporant HSA administrées par voie nasale sont capables d'engendrer une réponse systémique caractérisée par la présence majoritaire d'IgG mais également par un taux important d'IgA sérique. Seule la forme vectorisée conduit à cette production (IgA HSA seule = 35 ; IgA vésicules selon l'invention HSA = 17 620). Il est remarquable d'obtenir une réponse systémique de l'antigène vectorisé. Rappelons qu'il est extrêmement difficile d'induire une réponse IgA sérique par immunisation systémique avec un antigène seul ou accompagné d'un adjuvant autorisé en usage humain.

En conclusion de ces résultats, non seulement la forme dite encapsulée engendre une réponse immune pulmonaire mais aussi, seule cette forme permet la dissémination de la réponse induite dans le tractus respiratoire vers d'autres muqueuses indiquant que les vésicules selon l'invention sont des puissants vecteurs pour induire une immunité muqueuse, en favorisant la prise en charge et l'induction de la réponse au sein d'un site et en la redistribuant à d'autres sites.

Les capacités à engendrer une réponse immune muqueuse et à stimuler le tissu lymphoïde muqueux commun révèlent une importance particulière lorsque l'on s'adresse à des antigènes à potentiel vaccinant, face à des pathogènes invasifs à tropisme muqueux.

La double possibilité d'induire à la fois une réponse muqueuse et une réponse systémique présente un grand intérêt en vaccination car elle simplifie l'administration tout en offrant une immunité à plusieurs niveaux : muqueux pour défendre les voies d'accès aux micro-organismes et systémiques pour les infections plus disséminées ou généralisées.

REVENDICATIONS

1. Utilisation de vésicules multilamellaires à structure en oignon présentant une structure interne cristal-liquide formée d'un empilement de bicouches concentriques à base d'agents amphiphiles alternant avec des couches d'eau, de solution aqueuse ou de solution d'un liquide polaire et au sein desquelles se trouve incorporé au moins un antigène, pour la fabrication d'une composition vaccinale destinée à une administration par voie muqueuse pour induire une réponse muqueuse et/ou systémique sérique.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit antigène a une origine exogène ou naturelle intrinsèque.
3. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit antigène est choisi dans le groupe constitué :
 - des protéines, en particulier des protéines extraites ou recombinantes, glycosylées ou non,
 - des peptides,
 - des lipopeptides,
 - des polysaccharides,
 ou représente un mélange de plusieurs de ces composants.
4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que lesdites vésicules contiennent au moins un agent tensioactif choisi dans le groupe constitué :
 - des phospholipides hydrogénés ou non hydrogénés,
 - des acides gras en C₆ à C₃₀, saturés ou mono- ou polyinsaturés, linéaires ou ramifiés, sous forme d'acide ou de sel d'un métal alcalin, alcalino-terreux ou d'une amine,
 - des esters, éthoxylés ou non, de ces mêmes acides gras et
 - . de saccharose,
 - . de sorbitan,
 - . de mannitol,
 - . de glycérol ou de polyglycérol,
 - . de glycol,
 - des mono-, di- ou triglycérides ou des mélanges de glycérides de ces mêmes acides gras,
 - des alcools gras en C₆ à C₃₀, saturés ou mono- ou polyinsaturés, linéaires ou ramifiés, éthoxylés ou non,

- des éthers, éthoxylés ou non, de ces mêmes alcools gras et
 - . de saccharose,
 - . de sorbitan,
 - . de mannitol,
 - 5 . de glycérol ou de polyglycérol,
 - . de glycol,
- des huiles végétales polyéthoxylées, hydrogénées ou non hydrogénées,
- des polymères séquencés de polyoxyéthylène et de polyoxypropylène (poloxamères),
- 10 - de l'hydroxystéarate de polyéthylèneglycol,
- des alcools à squelette stérol tel que le cholestérol, le sistostérol,
- des sphingolipides,
- des polyalkylglucosides,
- des copolymères de polyéthylèneglycol et d'alkylglycol,
- 15 - des copolymères di- ou tribloc d'éthers de polyéthylèneglycol et de polyalkylèneglycol.

5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que lesdites vésicules contiennent en outre au moins un co-tensioactif destiné à améliorer la rigidité et/ou l'étanchéité des membranes desdites vésicules.

- 20 6. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que ledit co-tensioactif est choisi dans le groupe constitué :

- du cholestérol et de ses dérivés, en particulier les esters de cholestérol chargés ou neutres comme le sulfate de cholestérol
- des dérivés à squelette stérol, en particulier ceux d'origine végétale
- 25 - tels que le sitostérol ou le sigmastérol,
- des céramides.

7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que lesdites vésicules contiennent en outre une substance immuno-modulatrice.

8. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce
- 30 que lesdites vésicules ont un diamètre compris entre 0,1 et 25 μm , de préférence entre 0,2 et 15 μm .

9. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que les bicouches desdites vésicules comprennent au moins deux agents tensioactifs dont l'un présente une balance hydrophile-lipophile (HLB) comprise
- 35 entre 1 et 6, de préférence comprise entre 1 et 4, et l'autre une balance hydrophile-lipophile (HLB) comprise entre 3 et 15, de préférence comprise entre 5 et 15.

10. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que le rendement d'encapsulation de l'antigène (ou des antigènes) au sein desdites vésicules est supérieur à 50 %, de préférence supérieur à 80 %.

- 5 11. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que ladite administration par voie muqueuse est une administration par voie nasale.

Mode opératoire

Les composants sont stérilisés par irradiation UV pendant 60 mn. Les contenants et accessoires (spatules, agitateurs...) sont stérilisés à la flamme juste avant utilisation.

- 5 Les constituants ❶ à ❸ sont introduits dans un pilulier, dans un ordre indifférent, puis chauffés à 80°C pendant 60 min sous très forte agitation magnétique. La solubilisation totale des constituants ❸ et ❹ est vérifiée par observation microscopique.

- 10 On introduit à température ambiante dans un tube Eppendorf de 1,5 ml stérile la quantité désirée du mélange ❶ à ❸ puis on rajoute les constituants ❹ et ❺. L'ensemble est homogénéisé à l'aide d'une aiguille stérile, puis laissé au repos une nuit à 4°C.

La préparation est ensuite dispersée à 33,33 % dans du PBS 1x stérile.

15 **II - Protocole d'immunisation**

- Afin de tester l'effet des vésicules selon l'invention lors d'une administration muqueuse, des souris BALB/c femelles de 6-8 semaines ont reçu, par voie nasale, deux fois (à J0 et J30), différentes préparations décrites ci-dessous. L'administration par voie nasale nécessite l'anesthésie des animaux par
20 une solution, mélange de Kétamine, Valium et Atropine, injectée par voie intrapéritonéale. Un mois après la dernière immunisation, les animaux sont sacrifiés, les sérums sont collectés et les prélèvements des sécrétions muqueuses effectués, à l'exception des lavages vaginaux qui sont prélevés sur la souris vivante pendant les trois jours précédents la fin de l'expérimentation.

25

Groupe d'immunisation

- Les souris ont été réparties en 4 groupes notés I à IV, le groupe IV constituant un groupe témoin (souris non immunisées également dénommées souris naïves) et les autres groupes étant soumis à un protocole d'immunisation tel
30 que défini précédemment au moyen des produits suivants :

- groupe I :

- ◆ HSA encapsulée : 20µl par narine de vésicules selon l'invention incorporant HSA ce qui correspond à 80 µg de HSA par souris

35

- groupe II :

- ♦ HSA : 20µl par narine d'une solution de HSA correspondant à 80 µg par souris

5

- groupe III :

- ♦ Vésicules vides : 20µl par narine de vésicules selon l'invention vides

Prélèvements des sécrétions

Tous les prélèvements sont effectués avec des solutions froides (4°C) et sont entreposés sur glace au fur et à mesure afin de limiter les dégradations par les enzymes protéolytiques.

Lavages broncho-alvéolaires :

La trachée des souris est canulée à l'aide d'une sonde et 750µl de PBS sont injectés lentement afin de ne pas créer d'hémorragie, les poumons sont lavés ainsi 3 fois avec la même solution, le prélèvement est ensuite centrifugé afin d'éliminer les cellules pulmonaires et séparé en fractions aliquotes conservées à -20°C jusqu'au dosage.

20 *Lavages vaginaux*

Ces prélèvements sont réalisés sur la souris vivante non anesthésiée, par injection de 50µl de PBS dans l'orifice du vagin, le vagin est lavé 3 fois avec la même solution. Ce type de prélèvement est renouvelé durant 3 jours consécutifs afin de couvrir les variations dues au cycle hormonal de la souris. Les sécrétions sont groupées et conservées à -20°C.

Lavages intestinaux

L'intestin est prélevé, libéré du mésentère et rincé dans l'eau afin d'éliminer le sang extérieur. Il est ensuite découpé longitudinalement et incubé sur glace dans 1 ml d'une solution de lavage enrichie en inhibiteur de protéases. L'ensemble est centrifugé et le surnageant est récupéré et congelé à -20°C.

Dosage des anticorps

Les anticorps spécifiques de HSA présents dans les sérums et sécrétions sont dosés par technique ELISA où l'on détermine les IgA et IgG spécifiques de HSA (anti-IgA biotinyle/Streptavidine peroxydase, anti-IgG

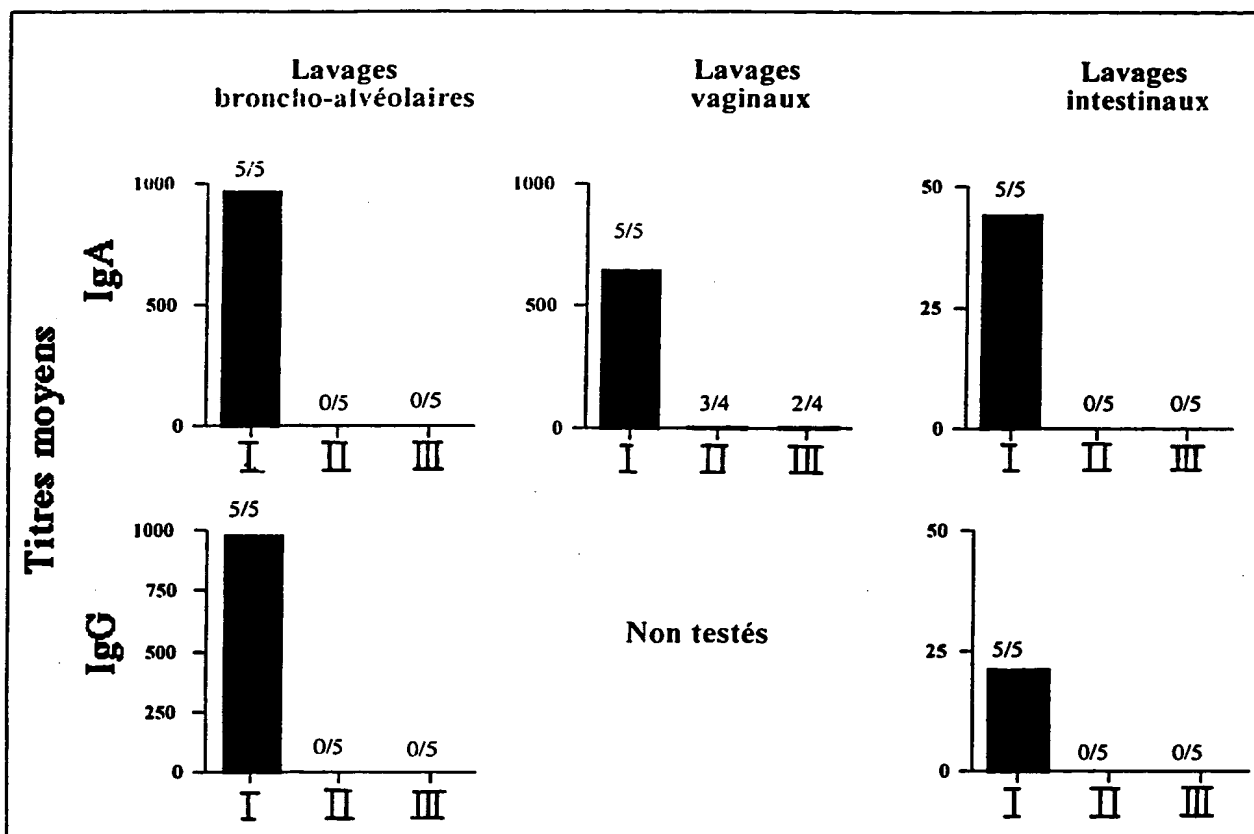


Figure 1

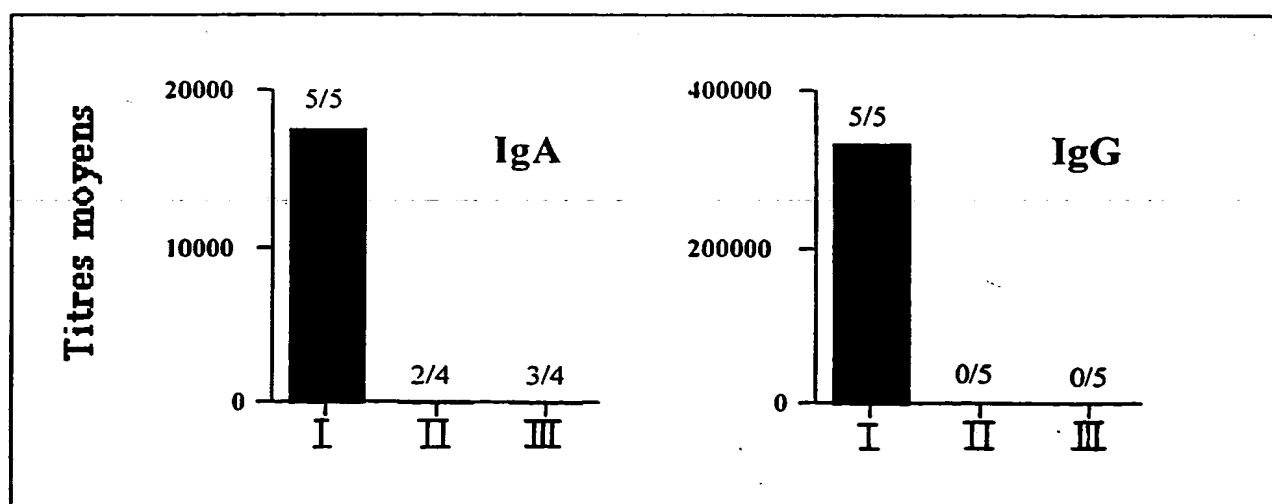


Figure 2